

**Pengaruh *Platelet-Rich Plasma* (PRP) Terhadap Proliferasi dan Viabilitas *Human Dermal Fibroblast* (HDF) dalam Konsentrasi Glukosa Tinggi  
(The Effect of Platelet-Rich Plasma PRP) on Proliferation and Viability of *Human Dermal Fibroblast* (HDF) at High Glucose Concentration)**

<sup>1)</sup>Restu Syamsul Hadi, <sup>2)</sup>Indra Kusumah, & <sup>3)</sup>Yurika Sandra

<sup>1)</sup>Bagian Biologi-Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, <sup>2)</sup>Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, <sup>3)</sup>Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas YARSI.

Email: restu.syamsul@yarsi.ac.id

Memasukkan: Agustus 2019, Diterima: Oktober 2019

**ABSTRACT**

The administration of Platelet Rich Plasma (PRP) is expected to be a supplement for treatment of diabetic wounds and hyperglycemia by increasing growth factors. The purpose of this study was to examine the effect of Platelet Rich Plasma (PRP) on the proliferation and viability of human dermal fibroblast (HDF) in high glucose conditions, as a model for healing diabetic wounds in vitro. HDF cells are grown in DMEM medium containing high glucose which are then with PRP. To measure the effect of PRP on the HDF cell proliferation, CCK-8 kit was used and evaluated by using a microplate reader. To evaluate the viability of HDF, an automated cell counter. The results of the research showed that PRP stimulate the HDF cells proliferation. The optimal dose of PRP to increase HDF cell proliferation is at dose of PRP 10%. Supplementation of PRP is significantly increased cell viability and HDF cell counts within 48 hours. The results showed PDGF growth factor secreted by PRP is increased significantly. The conclusion is PRP stimulated HDF cell proliferation and viability in a high glucose condition. This finding support the used of PRP as a therapy for diabetic wounds.

**Keywords:** proliferation, viability, human dermal fibroblast, platelet-rich plasma, diabetic

**ABSTRAK**

Pemberian *Platelet-Rich Plasma* (PRP) diharapkan menjadi suplemen untuk pengobatan luka diabetes dan hiperglikemia dengan meningkatkan faktor pertumbuhan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh PRP terhadap kemampuan proliferasi dan viabilitas sel *human dermal fibroblast* (HDF) dalam kondisi glukosa tinggi, sebagai model untuk penyembuhan luka diabetes secara in vitro. HDF ditanam dalam medium DMEM yang mengandung glukosa tinggi kemudian ditambahkan dengan PRP. Untuk mengukur efek PRP pada proliferasi HDF digunakan kit CCK-8 dan dievaluasi dengan menggunakan microplate reader. Untuk mengevaluasi viabilitas HDF digunakan *automatic cell counter*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PRP meningkatkan kemampuan proliferasi HDF. PRP meningkatkan proliferasi HDF secara optimal pada pemberian PRP 10%. Suplementasi PRP secara signifikan meningkatkan viabilitas sel dan jumlah sel HDF dalam waktu 48 jam. Hasil penelitian menunjukkan faktor pertumbuhan PDGF yang dikeluarkan oleh PRP meningkat secara signifikan. Kesimpulannya adalah PRP merangsang proliferasi sel HDF dan viabilitas dalam kondisi glukosa tinggi. Temuan ini mendukung penggunaan PRP sebagai terapi untuk luka diabetes.

**Kata Kunci:** proliferasi, viabilitas, human dermal fibroblast, platelet-rich plasma, diabetes

**PENDAHULUAN**

*Autologous Platelet-Rich Plasma* (PRP) adalah suspensi trombosit di plasma yang berasal dari darah utuh yang semakin banyak digunakan dalam praktik klinis untuk pengobatan ulkus kronis. Konsentrasi platelet di PRP adalah 2-6 kali lipat lebih tinggi daripada darah keseluruhan. Sifat kuratif PRP bergantung pada fakta bahwa trombosit adalah reseptor fisiologis dari berbagai

faktor pertumbuhan, dengan fungsi penyembuhan yang memiliki peran aktif dalam regenerasi jaringan. PRP adalah modalitas pengobatan yang aman dan efektif untuk ulkus non-penyembuhan kronis. Penggunaan PRP untuk mengobati luka/ulkus kronis tidak hanya dapat meningkatkan penyembuhan, tetapi juga mencegah amputasi ekstremitas bawah yang disebabkan oleh luka penyembuhan (Suthar *et al.* 2017).

Pada keadaan glukosa yang tinggi sebagai

akibat yang ditimbulkan oleh diabetes, fibroblast kulit dan ekstra kulit tampak terganggu dan selama bertahun-tahun. Model penelitian *in vitro* yang menciptakan kondisi hiperglikemia telah terbukti mengganggu fisiologi fibroblas yang normal dan merusak sekresi bahan matriks ekstraseluler. Gangguan penyembuhan luka disertai dengan berkurangnya kemampuan pertumbuhan sel dan migrasi disebabkan karena kurangnya faktor pertumbuhan dan komponen matriks ekstraseluler (ECM) (Berlanga-Acosta *et al.* 2013).

Suplementasi faktor pertumbuhan dan ECM bisa menjadi alternatif strategi pengobatan untuk mengembalikan potensi penyembuhan luka. Fibroblas asal dermis terkenal karena kemampuannya untuk mengeluarkan berbagai faktor pertumbuhan dan komponen ECM selama dalam kultur. Faktor pertumbuhan yang disekresikan ini dapat dikumpulkan sebagai *Dermal Fibroblast Conditioned Medium* (DFCM) (Nurul *et al.* 2014). Suplementasi DFCM ditunjukkan untuk meningkatkan kemampuan ekspansi sel keratinosit. Suplementasi bFGF dalam kultur fibroblas dermal meningkatkan produksi fibronectin meskipun tidak berpengaruh pada sintesis kolagen. Pengamatan ini menunjukkan bahwa fibroblas dermal yang dikultur dapat menginduksi produksi komponen ECM yang meningkatkan efisiensi pelekatan keratinosit (Chowdhury *et al.* 2012).

Glukosa menunjukkan efek toksik pada keratinosit dan sel lain yang tumbuh dengan adanya konsentrasi glukosa tinggi. Keratinosit epidermal manusia secara signifikan mengalami penurunan tingkat proliferasi dan rentang hidup replikasinya dan rentan melakukan apoptosis. Penelitian lain juga menegaskan bahwa kondisi hiperglikemik merusak kemampuan proliferasi keratinosit dan respons migrasinya selain efek sitotoksik yang timbul secara langsung (Berlanga-Acosta *et al.* 2013).

Paparan jangka pendek atau jangka panjang terhadap konsentrasi glukosa tinggi bersifat toksik bagi fibroblas yang menekan aktivitas biologis sel. Sementara itu telah dilaporkan bahwa penggunaan PRP dapat untuk mengobati ulkus kronis dan dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Oleh karena itu dilakukan penelitian peranan PRP terhadap kemampuan proliferasi dan viabilitas sel terhadap paparan glukosa tinggi sebagai model luka diabetik. Penelitian ini bertujuan untuk

mengkaji peranan *Platelet Rich Plasma* (PRP) terhadap kemampuan proliferasi dan viabilitas sel *human dermal fibroblast* (HDF) dalam keadaan glukosa tinggi sebagai model penyembuhan luka *in vitro*.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Prinsip pembuatan PRP adalah dengan sentrifugasi *whole blood* sehingga terpisah menjadi 3 lapisan yaitu lapisan dasar (eritrosit), lapisan tengah (*buffy coat*), dan lapisan atas (plasma). Sebanyak 10 ml darah vena diambil dan dicampurkan dengan antikoagulan sitrat dekstrosa formula A (ACD-A). Darah di sentrifugasi untuk pertama kali selama 7 menit dan kecepatan 1500 rpm, dengan cara putaran lambat yang membuat pemisahan darah menjadi 3 lapisan. Supernatan diambil dilanjutkan sentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 4800 rpm. Plasma bagian bawah sekitar 1 ml diambil sebagai PRP dan bagian atas diambil sebagai PPP. Lapisan PRP diambil dan di pindahkan ke tabung reaksi untuk disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  hingga saat digunakan.

*Human Dermal Fibroblast* (HDF) diperoleh dari biorepository Pusat Penelitian Sel Punca Universitas Yarsi. Sel HDF dengan cara menambahkan 9 ml medium DMEM ke dalam 1 ml larutan sel HDF pada tabung conical 15 ml. Selanjutnya di sentrifugasi selama 7 menit, 1500 rpm. Supernatan dibuang dan pellet sel dilarutkan dengan medium tumbuh berisi DMEM *high glucose* ditambah serum 10% dan antibiotik-antimikotik 1% pada flash T75. Selanjutnya dibiakan dalam incubator  $37^{\circ}\text{C}$  dan 5%  $\text{CO}_2$  hingga confluent.

Sel HDF ditanam dalam medium DMEM *high glucose* (glukosa kadar 4,5 g/L) ditambah serum 10% dan antibiotik-antimikotik 1% dalam cawan kultur 96 sumuran (*well*). Perlakuan Platelet-Rich Plasma (PRP) diberikan pada masing-masing *well* selama 48 jam dengan dosis PRP 2,5%, 5%, 10%, dan dosis PPP, 2,5%, 5%, 10%. Setelah itu dilakukan pengujian kemampuan proliferasi dengan Uji CCK-8 dengan cara menambahkan 10  $\mu\text{l}$  reagen CCK-8 ke dalam setiap *well* lalu diinkubasi selama 90 menit. Absorbansi dengan satuan optical density (OD)

dihitung menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

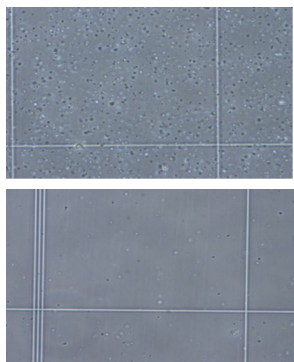
Sel HDF ditanam dalam medium DMEM *high glucose* (glukosa kadar 4,5 g/L) ditambah serum 10% dan antibiotik-antimikotik 1% dalam cawan kultur 6 *well*. Perlakuan *Platelet-Rich Plasma* (PRP) diberikan pada masing-masing *well* selama 48 jam dengan dosis PRP 2,5%, 5%, 10%, dan dosis PPP, 2,5%, 5%, 10%. Setelah itu dilakukan pengujian kemampuan viabilitasnya dengan cara memanen menggunakan *tripian blue* dan dihitung menggunakan *Automated cell counter* TC20.

Uji data dengan Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui bahwa data terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji statistik dengan SPSS. Uji dengan analisis varians parametrik (ANOVA) dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda post-hoc Tukey HSD untuk perbandingan antara kelompok, nilai  $p < 0,05$  dianggap signifikan. Data hasil penelitian disajikan sebagai nilai rata-rata  $\pm$  SD.

## HASIL

### *Platelet Rich Plasma* (PRP) dan Kultur Human Dermal Fibroblast

Pembuatan *Platelet Rich Plasma* (PRP) dilakukan dengan proses sentrifugasi sederhana dari darah tepi yang menghasilkan konsentrasi trombosit sekitar tiga sampai empat kali jumlah awal dalam darah lengkap (Gambar 1.) Pertumbuhan kultur *Human Dermal Fibroblast* (HDF) di dalam medium DMEM (glukosa kadar 4,5 g/L) ditambah serum 10% dan antibiotik-antimikotik 1% dan PRP menunjukkan pertumbuhan yang sama baiknya (Gambar 2).



**Gambar 1.** Gambaran mikroskopik PRP (atas) dan PPP (bawah).

### Pengaruh *Platelet Rich Plasma* (PRP) terhadap Proliferasi HDF

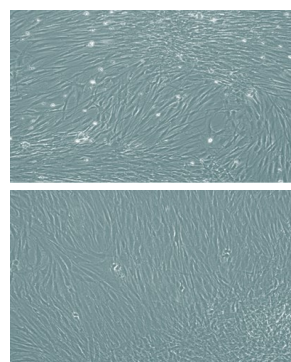
Pemberian PRP dengan variasi dosis yang berbeda (2,5%, 5% dan 10%) dilakukan untuk menentukan efek stimulasi maksimal pada proliferasi fibroblast. Pertumbuhan fibroblast meningkat sejalan dengan kenaikan dosis. Pada dosis PRP 10% menunjukkan efek yang kuat setara dengan pada control pemberian serum/ FBS 10% (Gambar 3).

### Pengaruh *Platelet Rich Plasma* (PRP) terhadap Viabilitas dan Jumlah sel HDF

Pemberian PRP dibandingkan terhadap kelompok perlakuan dengan variasi plasma yang lain (CM, Clot dan PPP) dilakukan untuk melihat kemampuannya dalam meningkatkan viabilitas selnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian PRP 10% memberikan efek stimulasi paling baik dibandingkan sediaan serum lainnya. Peningkatan viabilitas sel dengan pemberian PRP hampir 2,5 kali dari kontrol dengan pemberian serum (Gambar 4).

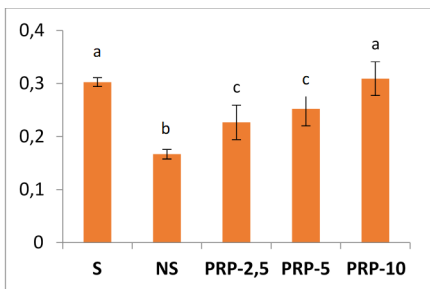
## PEMBAHASAN

Perlakuan PRP terhadap proliferasi menunjukkan bahwa PRP menstimulasi proliferasi *human dermal fibroblast* primer asal kulit manusia secara *in vitro*. PRP meningkatkan proliferasi HDF dengan dosis yang sama dengan 10% FBS. PRP dikaitkan dengan kandungan sejumlah besar faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit (PDGF) yang merangsang chemotaxis dan mitogenesis dalam sel fibroblast mengubah faktor-beta pertumbuhan (TGF- $\beta$ ), PRP adalah faktor pertumbuhan yang kaya trombosit.

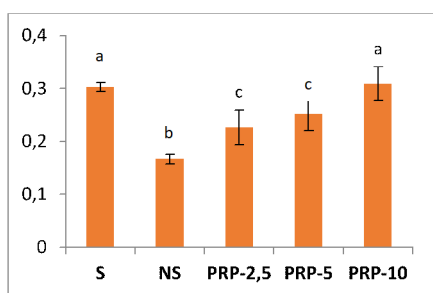


**Gambar 2.** Morfologi Sel HDF ditumbuhkan dalam Serum (atas) dan PRP (bawah).

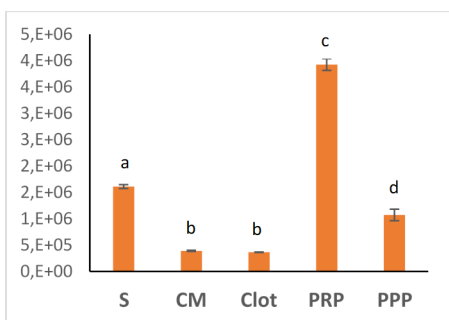
PRP mengandung komponen plasma seperti fibrin, fibronectin dan vitronektin (Setiawati & Maduretna 2010). PRP merupakan sediaan *autologous*, menjadikannya sebagai bahan pengobatan yang aman dibandingkan dengan sediaan allogenik dan bebas dari kekhawatiran penyakit menular (Suthar *et al.* 2017).



**Gambar 3.** Pengaruh variasi dosis PRP terhadap proliferasi sel HDF (OD) setelah inkubasi selama 48 jam. Keterangan : S (serum/FBS 10%), NS (non serum), PRP-2,5 (PRP dosis 2,5%), PRP-5 (PRP dosis 5%), PRP-10 (PRP dosis 10%).



**Gambar 4.** Pengaruh PRP terhadap viabilitas sel HDF (%) setelah inkubasi selama 48 jam. **Keterangan:** S (serum 10%), CM (*Conditioned Medium* HDF), Clot (PRP+CaCl<sub>2</sub>), PRP (*platelet rich plasma* 10%), PPP (*platelet poor plasma* 10%).



**Gambar 5.** Pengaruh PRP terhadap jumlah sel HDF setelah inkubasi selama 48 jam. **Keterangan:** S (serum 10%), CM (*Conditioned Medium* HDF), Clot (PRP+CaCl<sub>2</sub>), PRP (*platelet rich plasma* 10%), PPP (*platelet poor plasma* 10%). Uji statistik dengan huruf beda menunjukkan berbeda bermakna p>0,05

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan PRP dapat menginduksi fungsi penyembuhan model luka dengan *human dermal fibroblast*. Kemampuan ini penting dikaji lebih lanjut untuk mempercepat penyembuhan luka khususnya luka diabetik dalam kondisi hiperglikemia. Untuk itu terkait dengan prosedur regenerasi ulkus diabetik masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Karakterisasi PRP menggunakan ELISA sedang dilakukan termasuk pada secretom hasil sekresi HDF yang belum dilaporkan pada kelengkapan hasil penelitian ini.

PRP meningkatkan viabilitas dan jumlah sel pada kultur sel human dermal fibroblast. Kultur sel fibroblast diberikan stimulasi PRP tanpa adanya serum (*serum free media*) untuk melihat adanya peranan PRP tanpa terlibat adanya serum. Pemberian PRP terbukti meningkatkan jumlah sel dan kemampuan proliferasi sel HDF. Kemampuan peningkatan proliferasi oleh pemberian PRP juga dibuktikan dengan uji menggunakan CCK-8, peningkatan terjadi secara dose-dependent yang maksimal pada dosis 10%. Penelitian sebelumnya juga terbukti terjadi peningkatan proliferasi pada pemberian PRP pada kultur human dermal fibroblast alogenik platelet gel (Krasna *et al.* 2007).

Pada keadaan hiperglikemia dengan kadar glukosa tinggi pemberian serum (PRP, PPP dan clot) masih dapat meningkatkan proliferasi sel HDF, namun pemberian PRP yang paling kuat menstimulasi proliferasi sel. Kondisi kadar glukosa tinggi PRP masih dapat meningkatkan proliferasi sel dan kemampuan stimulasinya lebih tinggi dibandingkan PPP. Kemampuan PRP untuk dapat meningkatkan proliferasi sel dalam keadaan ini dapat diaplikasikan untuk terapi pada penyembuhan luka diabetik (Ahmed *et al.* 2017). Kondisi ini dapat dipahami karena PRP mengandung trombosit yang melepaskan faktor pertumbuhan, seperti PDGF, transforming growth factor (TGF)-b1, TGF-b2, platelet factor IV, interleukin-1, platelet-derived angiogenesis factor, VEGF, EGF, *insulin-like growth factor*, osteokalsin, osteonektin, fibrinogen, vitronektin, fibronectin, dan thrombospondin-1 yang semuanya menstimulasi proliferasi sel (Ahmed *et al.* 2017).

Hasil penelitian ini menunjukkan kemampuan PRP untuk dapat meningkatkan proliferasi sel human dermal fibroblast (HDF) dalam kondisi

hiperglikemia karena mengandung sejumlah sitokin dan faktor pertumbuhan yang dapat meningkatkan kemampuan untuk pertumbuhan sel HDF maupun sel otot (Mifune *et al.* 2013). Komposisi PRP dijelaskan banyak mengandung *growth factor* yang penting bagi proses penyembuhan luka. Temuan ini didukung oleh laporan yang menyatakan bahwa penggunaan PRP dalam penyembuhan luka dan regenerasi jaringan, karena adanya konsentrasi tinggi PDGF dan TGF dikeluarkan dari platelet  $\alpha$ -granula setelah aktivasi (Amable *et al.* 2013).

Stimulasi proliferasi HDF oleh PRP yang diperlihatkan pada penelitian ini dapat dijelaskan akibat adanya peranan PRP yang meningkatkan ekspresi kolagen dan MMP tipe I (Kim *et al.* 2011). Hal ini menunjukkan bahwa PRP memiliki potensi untuk mempromosikan remodeling kulit dalam penyembuhan luka. Dengan mempertimbangkan kajian terhadap efikasi dan keamanan klinis, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengkaji mekanisme dan keamanan pada terapi autologous pada pasien yang memerlukannya.

## KESIMPULAN

*Platelet Rich Plasma* (PRP) dapat meningkatkan kemampuan proliferasi dan viabilitas sel HDF dalam keadaan hiperglikemia *in vitro*. Kemampuan PRP dalam meningkatkan proliferasi dan viabilitas sel HDF yang didukung dengan peningkatan jumlah pertumbuhan sel.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Kemristekdikti dengan Program Desentralisasi Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2018.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, M., A. Sherif, Reffat, A. Hassan, & F. Eskander. 2017. "Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Clean Diabetic Foot Ulcers." *Annals of Vascular Surgery* 38: 206–11.
- Amable, PR., RBV. Carias, MVT. Teixeira, IC. Pacheco, RJFC. Amaral, JM. Granjeiro, & R. Borojevic 2013. "Platelet-Rich Plasma Preparation for Regenerative Medicine: Optimization and Quantification of Cytokines and Growth Factors." *Stem Cell Research & Therapy* 4 (3): 67.
- Berlanga-Acosta, J., S. Gregory, ELM. Schultz, G. Guillen-Nieto, M. Garcia-Siverio, & L. Herrera-Martinez 2013. "Glucose Toxic Effects on Granulation Tissue Productive Cells: The Diabetics' Impaired Healing." *BioMed Research International* no. ID256043: 1–15.
- Chowdhury, SR., BS. Aminuddin, & BHI. Ruzzymah 2012. Effect of Supplementation of Dermal Fibroblasts Conditioned Medium on Expansion of Keratinocytes through Enhancing Attachment." *Indian Journal of Experimental Biology* 50 (5): 332–39.
- Kim, DH., YJ. Je, CD. Kim, & JH. Lee. 2011. "Can Platelet-Rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-Rich Plasma on Human Dermal Fibroblast." *Ann Dermatol* 23 (4): 424–31.
- Krasna, M, D. Domanović, TU. Svajger, & M. Jeras 2007. Platelet Gel Stimulates Proliferation of Human Dermal Fibroblasts *in Vitro*. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica* 16 (3): 105–10.
- Mifune, Y., T. Matsumoto, K. Takayama, S. Ota, H. Li, LB. Meszaros, & A. Usas. 2013. "The Effect of Platelet-Rich Plasma on the Regenerative Therapy of Muscle Derived Stem Cells for Articular Cartilage Repair." *Osteoarthritis and Cartilage* 21 (1): 175–85.
- Nurul 'IAG., SR. Chowdhury, M. Manira, BS. Aminuddin, & BHI. Ruzzymah 2014. "The Effect of Nasal Fibroblast Conditioned Medium on *in Vitro* Wound." *Regenerative Research* 3(2): 88–89.
- Setiawati, & E. Maduratna. 2010. "Natural Growth Factor: Platelet Rich Plasma Stimulates Proliferation of Fibroblast Cell Culture." *Indones Journal Tropical Infectious Disease* 1 (2): 102–4.
- Suthar, M. S. Gupta, S. Bukhari, & V. Ponemone. 2017. "Treatment of Chronic Non-Healing Ulcers Using Autologous Platelet Rich Plasma: A Case Series." *Journal of Biomedical Science* 24 (16): 1–10.

